



HiSelect At 4FF

目录

1. 产品介绍.....	1
2. 纯化流程.....	1
3. 残留配体的去除.....	2
4. 填料清洗.....	2
5. 问题及解决方案.....	2
6. 订购信息及相关产品.....	2

1. 产品介绍

Protein At Beads 4FF 是用于分离和纯化单克隆抗体、多克隆抗体或 Fc-融合蛋白的亲合层析介质。Protein A 是一种分离自金黄色葡萄球菌的细胞壁蛋白，主要通过 Fc 片段结合哺乳动物 IgG。**Protein At Beads 4FF** 的配体蛋白 Protein At 是在天然蛋白 A 的基础上进行生物工程突变得到的一种耐碱蛋白 A (Alkaline tolerate, 故缩写为 At)。**Protein At Beads 4FF** 配体脱落量低 (小于 10 ng/mg IgG)，该产品可以耐受 0.1 M-0.5 M NaOH 的在位清洗，更加方便客户尤其是工业客户的清洗操作。

HiSelect At 4FF 是一种中压预装柱，填充 4.7 ml 的 **Protein At Beads 4FF** 介质。柱管由生物相容性聚丙烯制成，不与生物分子相互作用。柱管两头都有堵头，防止保护液的泄露。柱体标签上的箭头表示推荐的流向。预装柱具有标准接口，可以适配商品化的各类中压色谱系统，如 ÄKTA 等，方便客户操作。

表 1. HiSelect At 4FF 产品性能

项目	性能
规格	4.7 ml
基质	高度交联的 4% 琼脂糖
平均粒径	~ 90 μm
配体	耐碱性 Protein A
结合载量	> 40 mg Human IgG/ml 介质
化学稳定性	可耐受抗体纯化过程中的所有试剂
工作 pH	3-12
在线清洗	0.1-0.5 M NaOH
线性流速	50-300 cm/h
柱尺寸 (内径×高度)	0.77×10 cm
储存缓冲液	含 20% 乙醇的 1×PBS
储存温度	2-8℃

2. 纯化流程

2.1 缓冲液的准备

所用水和缓冲液在使用之前建议用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤。

平衡/洗杂液: 0.15 M NaCl, 20 mM Na₂HPO₄, pH7.0

洗脱液: 0.1 M 甘氨酸, pH3.0

中和液: 1 M Tris-HCl, pH8.5

2.2 样品准备

上柱前要确保样品溶液有合适的离子强度和 pH 值，可以用平衡/洗杂液对血清样品、腹水或细胞培养液稀释，或者样品用平衡/洗杂液透析。样品在上样前建议离心或用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤，减少杂质，提高蛋白纯化效率和防止堵塞柱子。

2.3 样品纯化

HiSelect At 4FF 是一种分离和纯化单克隆抗体、多克隆抗体或 Fc-融合蛋白的预装柱，可以用各种常规的中低压色谱系统。

- 1) 将泵管道中注满去离子水。去掉上塞子，将层析柱连接至色谱系统中。再打开下口，将预装柱接到色谱系统中，并旋紧。
- 2) 用 3-5 倍柱体积的去离子水冲洗出存储缓冲液。
- 3) 使用至少 5 倍柱床体积的平衡液平衡色谱柱。





4) 利用泵或样品环上样。

注: 样品的粘度增加使得即使上样体积很少, 也会导致层析柱很大的反压。上样量不要超过柱子的结合能力。大量的样品体积也可能造成很大的反压, 使得进样器更难使用。

5) 用洗杂液冲洗柱子, 直到紫外吸收达到一个稳定的基线 (一般至少 10-15 个柱体积)。

6) 用 5 倍柱体积洗脱液洗脱, 收集样品, 中和液中性和至中性保存。

注: 首次使用时, 可先按照 4 填料清洗中 CIP 清洗一遍, 避免脱落的配体残留。

7) 依次使用 3 倍柱体积的平衡液和 5 倍柱体积的去离子水平衡填料, 最后再用 5 倍柱体积的含 20%乙醇的 1×PBS 平衡, 然后将预装柱置于 2-8℃保存, 防止填料被细菌污染。

2.4 SDS-PAGE 检测

将使用纯化产品得到的样品 (包括流出组分、洗杂组分和洗脱组分) 以及原始样品使用 SDS-PAGE 检测纯化效果。

3. 残留配体的去除

Protein At Beads 4FF 配体的脱落很低, 小于 10 ng/mg 抗体。但是很多产品需要完全去除, 可采用阳离子交换、阴离子交换或凝胶过滤等方法去除, 具体参照阳离子交换介质、阴离子交换介质和凝胶过滤介质的使用。

4. 填料清洗

HiSelect At 4FF 可以重复使用而无需再生, 但随着一些变性物质的沉淀和蛋白的聚集, 往往造成流速和结合载量都下降, 严重影响柱子的性能, 这时需要对填料进行清洗。

CIP 清洗

Protein At Beads 4FF 是一种耐碱亲和介质, 可以耐受 0.1 M-0.5 M NaOH 溶液的清洗, 成本低, 效果好, 具体操作:

- 3 倍柱体积的平衡液;
- 至少 2 倍柱体积的 0.1–0.5 M NaOH, 接触时间为 10-15 minutes;
- 5 倍柱体积的平衡液冲洗。

注: 因 0.1–0.5 M NaOH 粘度大易造成压力增加, 可进行低流速反向冲洗。

5. 问题及解决方案

问题	原因分析	推荐解决方案
柱子反压过高	筛板被堵塞	清洗或更换筛板
	填料被堵塞	按照第4部分进行填料CIP清洗 裂解液中含有微小的固体颗粒, 建议上柱前使用滤膜 (0.22或0.45μm) 过滤, 或者离心去除。
样品纯化过程中曲线不稳	样品或缓冲液中有气泡	去除样品或柱子中的气泡
		样品和缓冲液进行脱气
洗脱组分中没有目的蛋白	样品中抗体浓度太低	使用其抗原做配体的介质
	抗体被降解	适当的提高洗脱pH
回收率逐渐减低	上样量太多	减少上样量
	柱子太脏, 载量降低	按照第4部分进行填料CIP清洗

6. 订购信息及相关产品

产品名称	货号	规格
HiSelect At 4FF	SA023C47	1×4.7 ml
HiPur At 4FF	SA023C20	1×20 ml

